

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月10日

出願番号
Application Number: 特願2004-066801
[ST. 10/C]: [JP 2004-066801]

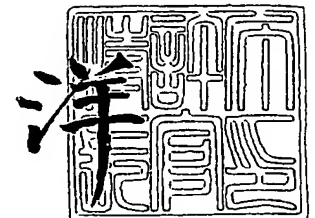
出願人
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2005年 1月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P047904
【提出日】 平成16年 3月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07H 21/04
C07H 1/08

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 丁目 1 1 番 4 6 号 富士写真フイルム株式
会社内
【氏名】 猪股 弘子

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 丁目 1 1 番 4 6 号 富士写真フイルム株式
会社内
【氏名】 半戸 里江

【特許出願人】
【識別番号】 000005201
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】
【識別番号】 100105647
【弁理士】
【氏名又は名称】 小栗 昌平
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100105474
【弁理士】
【氏名又は名称】 本多 弘徳
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100108589
【弁理士】
【氏名又は名称】 市川 利光
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100115107
【弁理士】
【氏名又は名称】 高松 猛
【電話番号】 03-5561-3990

【選任した代理人】
【識別番号】 100090343
【弁理士】
【氏名又は名称】 濱田 百合子
【電話番号】 03-5561-3990

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 092740
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0003489

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

(1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、

(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸が吸着した状態で該多孔性膜を洗浄する工程、及び

(3) 回収液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程

を含有する核酸分離精製方法において、該核酸吸着性多孔性膜はイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であり、且つ、前記核酸を含む試料溶液が、

(a) 検体を容器に注入する工程、

(b) 前記容器に、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤の中から選ばれる化合物を含む前処理液を添加し、検体を混合し、混合液を得る工程、

(c) 前記混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程

を含む方法で得られることを特徴とする核酸分離精製方法。

【請求項 2】

前記の前処理液中、核酸安定化剤が 0.1～20 質量%の濃度で使用されることを特徴とする請求項 1 に記載の核酸分離精製方法。

【請求項 3】

前記の核酸安定化剤が還元剤であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の核酸分離精製方法。

【請求項 4】

前記の還元剤がメルカプト化合物であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 5】

前記のメルカプト化合物が β -メルカプトエタノールであることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 6】

前記のカオトロピック塩がグアニジウム塩である請求項 1～5 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 7】

前記の水溶性有機溶媒が、メタノール、エタノール、プロパノール、およびブタノールのいずれかを含むことを特徴とする請求項 1～6 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 8】

前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させることを特徴とする請求項 1～7 の何れかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 9】

前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの前記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させることを特徴とする請求項 1～8 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 10】

前記核酸吸着性多孔性膜が、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物を鹼化処理した有機材料からなる多孔性膜であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 11】

前記鹼化処理により得られる有機材料の鹼化率が 5%以上であることを特徴とする請求

項 10 に記載の核酸分離精製方法。

【請求項 12】

前記鹼化処理により得られる有機材料の鹼化率が 10 % 以上であることを特徴とする請求項 10 に記載の核酸分離精製方法。

【請求項 13】

前記核酸吸着性多孔性膜が、再生セルロースの多孔性膜であることを特徴とする請求項 10 に記載の核酸分離精製方法。

【請求項 14】

前記核酸吸着性多孔性膜が、表裏非対称性の多孔性膜であることを特徴とする請求項 1 ～ 13 のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【請求項 16】

請求項 1 ～ 14 のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を分離精製する方法に関する。より詳細には、本発明は、核酸を分離精製するために、検体から核酸を含む試料溶液を得る方法に関する。さらに詳しくは、得られた核酸を含む試料溶液を用いて、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力差発生装置を用いて、核酸を含む試料溶液から核酸を分離精製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形態で用いることが要求される。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の形態で種々の目的に用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の目的により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料から核酸を精製する場合には、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

広く知られた分離精製方法の一つに、核酸を二酸化珪素、シリカポリマー、珪酸マグネシウム等の固相に吸着させ、これに引き続いて洗浄、脱着等の操作を行い分離精製する方法がある（例えば、特許文献1）。この方法は、分離性能として優れているが、簡便性、迅速性、自動化適性において充分といえず、またこの方法に用いられる器具および装置は自動化および小型化に不向きであり、さらに器具および装置、特に吸着媒体を同一性能で工業的に大量生産することが困難であり、かつ取扱いが不便で、種々の形状に加工しがたい等の問題点がある。

【0006】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が提案されている（特許文献2）が、更なる改良が望まれる。

【0007】

その他に、従来から知られている核酸分離精製法としては、遠心法によるもの、磁気ビーズを用いるもの、フィルターを用いるものなどがある。また、これらを利用した核酸分離精製装置が提案されている。例えば、フィルターを用いた核酸分離精製装置としては、フィルターを収容したフィルターチューブをラックに多数セットし、これに核酸を含む試料溶液を分注し、前記ラックの底部の周囲をシール材を介してエアチャンバーで密閉して内部を減圧し、全フィルターチューブを同時に排出側より吸引し試料液を通過させて核酸をフィルターに吸着し、その後、洗浄液および回収液を分注して、再び減圧吸引して洗浄・脱着するようにした自動装置が提案されている（例えば、特許文献3参照）。

【0008】

しかしながら、これらの自動装置は、大型で、多量の検体を分析するのには適するものの、検体数が少なく分析頻度の少ない場合には、高価で不向きであるとともに、処理効率

が低くなる問題を有する。特に、採取全血のような試料溶液とする各液の特性が異なる場合に、特許文献3のように全体を同時に吸引するものでは、一部のフィルターチューブの吸引が終了してその減圧による抵抗がなくなると、他のフィルターチューブに作用する減圧が小さくなる。この際に、粘度の高い試料溶液の処理が終了しない場合が生じることがある。これに対して、減圧容量を増大することは装置の小型化を図る際の障害となり、減圧容量（減圧容積）が大きいために減圧を作用させるまでの時間が掛かることになり、また、試料溶液が全部排出されたことを確認することが困難で、このため時間設定を長くする必要があり、処理効率の向上の障害となる。また、逆に粘度の低い試料溶液では、フィルターチューブから勢いよく試料溶液が排出されることにより、泡状の飛沫が隣接するフィルターチューブおよびラックに付着し、コンタミネーションを生じることがあり、精度低下を招くという問題がある。

【特許文献1】特公平7-51065号公報

【特許文献2】特開2003-128691号公報

【特許文献3】特許第2832586号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、検体中の核酸を多孔性膜に吸着させた後、洗浄を経て脱着させて核酸を分離精製する方法において、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化適性に優れ、当該方法に用いられる器具および装置が自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能である、核酸分離精製方法を提供することである。

本発明の他の目的は、短時間で効率よく、しかもコンタミネーションの発生を抑制して処理でき、かつ、小型化が可能な、核酸分離精製装置を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは前記課題を解決するために鋭意検討した結果、核酸を多孔性膜に吸着させた後、洗浄を経て脱着させて核酸を分離精製する方法において、該多孔性膜としてイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜を用い、かつ核酸を含む試料溶液を特定の工程を含む方法によって得ることによって、分離性能に優れ、洗浄効率が良く、簡便で、迅速で、自動化適性に優れ、当該方法に用いられる器具および装置が自動化および小型化適性に優れ、実質的に同一の分離性能を有するものを大量に生産可能な、核酸分離精製方法が得られることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0011】

すなわち、本発明は、以下の構成により前記目的を達成したものである。

【0012】

1. (1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、

(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸が吸着した状態で該多孔性膜を洗浄する工程、及び

(3) 回収液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程

を含有する核酸分離精製方法において、該核酸吸着性多孔性膜はイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であり、且つ、前記核酸を含む試料溶液が、

(a) 検体を容器に注入する工程、

(b) 前記容器に、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤の中から選ばれる化合物を含む前処理液を添加し、検体を混合し、混合液を得る工程、

(c) 前記混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程

を含む方法で得られることを特徴とする核酸分離精製方法。

【0013】

2. 前記の前処理液中、核酸安定化剤が0.1～10質量%の濃度で 사용되는ことを特徴とする前記1に記載の核酸分離精製方法。

【0014】

3. 前記の核酸安定化剤が還元剤であることを特徴とする前記1又は2に記載の核酸分離精製方法。

【0015】

4. 前記の還元剤がメルカプト化合物であることを特徴とする前記1～3のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0016】

5. 前記のメルカプト化合物が β -メルカプトエタノールであることを特徴とする前記1～4のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0017】

6. 前記のカオトロピック塩がグアニジウム塩である前記1～5のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0018】

7. 前記の水溶性有機溶媒が、メタノール、エタノール、プロパノール、およびブタノールのいずれかを含むことを特徴とする前記1～6のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0019】

8. 前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させることを特徴とする前記1～7の何れかに記載の核酸分離精製方法。

【0020】

9. 前記(1)、(2)及び(3)の各工程において、少なくとも二つの開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの前記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いてカートリッジ内を加圧状態にして、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させることを特徴とする前記1～8のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0021】

10. 前記核酸吸着性多孔性膜が、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物を鹼化処理した有機材料からなる多孔性膜であることを特徴とする前記1～9のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0022】

11. 前記鹼化処理により得られる有機材料の鹼化率が5%以上であることを特徴とする前記10に記載の核酸分離精製方法。

【0023】

12. 前記鹼化処理により得られる有機材料の鹼化率が10%以上であることを特徴とする前記10に記載の核酸分離精製方法。

【0024】

13. 前記核酸吸着性多孔性膜が、再生セルロースの多孔性膜であることを特徴とする前記10に記載の核酸分離精製方法。

【0025】

14. 前記核酸吸着性多孔性膜が、表裏非対称性の多孔性膜であることを特徴とする前記1～13のいずれかに記載の核酸分離精製方法。

【0026】

15. 前記1～14のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための、核酸分離精製カートリッジと試薬のキット。

【0027】

16. 前記1～14のいずれかに記載の核酸分離精製方法を行うための装置。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

本発明の核酸分離精製方法は、(1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(2) 該核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、及び(3) 回収液を、該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程を少なくとも含むものである。かつ、該核酸吸着性多孔性膜としてイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜を少なくとも用いるものである。さらに加えて、核酸を含む試料溶液を、少なくとも

(a) 検体を容器に注入する工程、

(b) 前記容器に、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤の中から選ばれる化合物を含む前処理液を添加し、検体を混合し、混合液を得る工程、

(c) 前記混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程

により得るものである。

まず、核酸を含む試料溶液を得る(a)～(c)の工程について述べる。

【0029】

(a) 検体を容器に注入する工程。

本発明において使用できる検体は、核酸を含むものであれば特に制限はなく、例えば診断分野においては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物(又はその一部)、動物(またはその一部)、細菌、ウイルスなど、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料が対象となる。

【0030】

検体は、ホモジナイズ処理することが好ましい。このことにより、自動化処理適正を向上することができる。ホモジナイズ処理としては、例えば、超音波処理、鋭利な突起物の使用、高速攪拌処理、微細空隙から押し出す処理、ガラスビーズを用いる処理等で行うことができる。

【0031】

検体を注入する容器としては、限定されないが、プラスチック製のチューブやガラス製のバイアルや試験管などが好ましい。これらの容器が、ヌクレアーゼフリーかつパイロジェンフリーであれば、より好ましい。

検体を容器に注入する際の注入方法としては、限定はされないが、ピペットやスポイトなどの実験用器具を使用するのが好ましい。これらの器具が、ヌクレアーゼフリーかつパイロジェンフリーであれば、より好ましい。

【0032】

(b) 前記容器に、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤の中から選ばれる化合物を含む前処理液を添加し、検体を混合し、混合液を得る工程。

前記(b)の工程により、検体の細胞膜および核膜等を溶解して核酸を可溶化する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散した溶液を得ることができる。

【0033】

前記(b)の工程において、容器には、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤の中から選ばれる化合物を含む前処理液を添加する。カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤は、いわゆる核酸可溶化試薬と呼ばれているものであり、細胞膜を溶解して核酸を可溶化する働きをもつ化合物である。

【0034】

前記カオトロピック塩としては、グアニジン塩、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナト

リウム、ヨウ化カリウム等を使用することができる。中でもグアニジン塩が好ましい。グアニジン塩としては、塩酸グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジンが挙げられ、中でも塩酸グアニジンが好ましい。これらの塩は単独でも、複数組み合わせ用いてもよい。前記前処理液中のカオトロピック塩濃度は、0.5 M以上であることが好ましく、より好ましくは0.5 M~4 M、さらに好ましくは、1 M~3 Mである。

カオトロピック塩の代わりに、カオトロピック物質として尿素を用いることもできる。

【0035】

前記界面活性剤としては、例えば、ノニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、両性界面活性剤が挙げられる。

本発明においてはノニオン界面活性剤およびカチオン界面活性剤を好ましく用いることができる。

ノニオン界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤、脂肪酸アルカノールアミドが挙げられ、好ましくは、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤である。ポリオキシエチレンアルキルエーテル系界面活性剤のなかでも、POEデシルエーテル、POEラウリルエーテル、POEトリデシルエーテル、POEアルキレンデシルエーテル、POEソルビタンモノラウレート、POEソルビタンモノオレエート、POEソルビタンモノステアレート、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、POEアルキルアミン、POEアセチレングリコールがさらに好ましい。

【0036】

カチオン界面活性剤としては、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロリド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロリド、セチルピリジニウムクロリドが挙げられる。

これらの界面活性剤は、単独または複数組み合わせ用いてもよい。界面活性剤の前記前処理液における濃度は0.1~20質量%であることが好ましい。

【0037】

消泡剤としては、シリコン系消泡剤（例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンパウンドなど）、アルコール系消泡剤（例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルエキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど）、エーテル系消泡剤（例えば、ヘプチルセロソルブ、ノニルセロソルブー3-ヘプチルコルビトールなど）、油脂系消泡剤（例えば、動植物油など）、脂肪酸系消泡剤（例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属セッケン系消泡剤（例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど）、脂肪酸エステル系消泡剤（例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど）、リン燐酸エステル系消泡剤（例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど）、アミン系消泡剤（例えば、ジアミルアミンなど）、アミド系消泡剤（例えば、ステアリン酸アミドなど）、その他の消泡剤（例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど）などが挙げられる。好ましくは、シリコン系消泡剤、アルコール系消泡剤である。アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤が好ましい。これらの消泡剤は、単独または複数組み合わせ用いてもよい。特に好ましくは、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を組み合わせ使用することである。

消泡剤の前記前処理液における濃度は0.1~10質量%であることが好ましい。

【0038】

タンパク質分解酵素としては、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、金属プロテアーゼが挙げられ、少なくとも1つのタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。また、タンパク質分解酵素は、複数種以上のタンパク質分解酵素の混合物も好ましく用いることができる。

前処理液は、核酸の回収量及び回収効率の向上、必要な核酸を含む検体の微量化及び迅速化の観点から、タンパク質分解酵素を含むことが好ましい。

セリンプロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばプロテアーゼKなどを好ましく用いることができる。システインプロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばパパイン、カテプシン類などを好ましく用いることができる。金属プロテアーゼとしては、特に限定されず、例えばカルボキシペプチターゼ等を好ましく用いることができる。

タンパク質分解酵素の前記前処理液における濃度は、添加時の全容積 1 ml あたり好ましくは 0.001 IU ~ 10 IU、より好ましくは 0.01 IU ~ 1 IU で用いることができる。

【0039】

また、タンパク質分解酵素は、核酸分解酵素を含まないタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。また、安定化剤を含んだタンパク質分解酵素を好ましく用いることができる。安定化剤としては、金属イオンを好ましく用いることができる。具体的には、マグネシウムイオンが好ましく、例えば塩化マグネシウムなどの形で添加することができる。タンパク質分解酵素の安定化剤を含ませることにより、核酸の回収に必要なタンパク質分解酵素の微量化が可能となり、核酸の回収に必要なコストを低減することができる。

タンパク質分解酵素の安定化剤の前記前処理液における濃度は、好ましくは 1 ~ 100 mM、より好ましくは 10 ~ 100 mM で含有することが好ましい。

【0040】

タンパク質分解酵素は、予めカオトロピック塩、界面活性剤等のその他の試薬とともに混合されて前処理液（以下、前処理液Aという。）として核酸の回収に供されても良い。

また、タンパク質分解酵素は、カオトロピック塩、界面活性剤等のその他の試薬を含む前処理液（以下、前処理液Bという。）とは個別の2つ以上の試薬として供されても良い。後者の場合、タンパク質分解酵素を含む試薬を先に検体と混合した後に、前処理液Bと混合される。また、前処理液Bを先に検体と混合した後に、タンパク質分解酵素を混合してもよい。

また、タンパク質分解酵素を検体または、検体と前処理液Bとの混合液に、タンパク質分解酵素保存容器から直接目薬状に滴下させることもできる。この場合、操作を簡便にすることができる。

【0041】

前処理液は、乾燥された状態、すなわち前処理剤として供給されることも好ましい。また、凍結乾燥のように乾燥された状態のタンパク質分解酵素を予め含む容器を用いることができる。前記の、前処理剤、および／または乾燥された状態のタンパク質分解酵素を予め含む容器を用いて、核酸を含む試料溶液を得ることもできる。

前記の方法で核酸を含む試料溶液を得る場合、前処理剤および乾燥された状態のタンパク質分解酵素の保存安定性が良く、核酸収量を変えずに操作を簡便にすることができる。

【0042】

核酸安定化剤としては、ヌクレアーゼの活性を不活性化させる作用を有するものが挙げられる。検体によっては、核酸を分解するヌクレアーゼ等が含まれていることがあり、核酸をホモジナイズするとこのヌクレアーゼが核酸に作用し、収量が激減することがある。前記核酸安定化剤は、検体中の核酸を安定に存在させることができ、好ましい。

前記前処理液は、核酸安定化剤を含むことが好ましい。より好ましくは、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素のいずれか1つ以上と共存させる。これにより、核酸の回収量及び回収効率が向上し、検体の微量化及び迅速化が可能となり、好ましい。

【0043】

ヌクレアーゼの活性を不活性化させる作用を有する核酸安定化剤としては、一般的に還元剤として使用される化合物を用いることができる。還元剤としては、水素、ヨウ化水素、硫化水素、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム等の水素化合物、アルカリ金属、マグネシウム、カルシウム、アルミニウム、亜鉛等の電気的陽性の大きい金属、またはそのアマルガム、アルデヒド類、糖類、ギ酸、シュウ酸などの有機酸化合物、メルカプト化合物等が挙げられる。中でもメルカプト化合物が好ましい。メルカプト化

合物としては、N-アセチルシステイン、メルカプトエタノールや、アルキルメルカプタン等が挙げられる。特に、 β -メルカプトエタノールが好ましい。メルカプト化合物は単独または複数組み合わせ用いてもよい。

核酸安定化剤は、前処理液における濃度は0.1~20質量%であることが好ましく、より好ましくは、0.3~15質量%で、用いることができる。メルカプト化合物は、前処理液における濃度は0.1~10質量%であることが好ましく、より好ましくは、0.5~5質量%で、用いることができる。

【0044】

(b)の工程において、前処理液を容器に添加するには、限定はされないが、ピペットやスポイトなどの実験用器具を使用するのが好ましい。これらの器具が、ヌクレアーゼフリーかつパイロジェンフリーであれば、より好ましい。

(b)の工程において、検体を混合する方法は、特に限定されない。例えば、混合する際、攪拌装置により30から3000rpmで1秒から3分間混合することが好ましい。これにより、分離精製される核酸収量を増加させることができる。または、転倒混和を5から30回行うことで混合することも好ましい。また、ピペッティング操作を、10から50回行うことによっても混合することができる。この場合、簡便な操作で分離精製される核酸収量を増加させることができ、好ましい。

【0045】

(c)前記混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程。

水溶性有機溶媒としては、アルコール類、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド等上げられる。これらの中でも、前処理液に含まれる前記化合物の溶解性を上げることができることから、アルコール類が好ましい。アルコール類としては、1級アルコール、2級アルコール、3級アルコールのいずれでも良い。中でもメタノール、エタノール、プロパノール及びその異性体、ブタノール及びその異性体をより好ましく用いることができる。これらの水溶性有機溶媒は、単独でも複数組み合わせ用いてもよい。これら水溶性有機溶媒の前処理液における濃度は1~20質量%であることが好ましい。

【0046】

また、これら水溶性有機溶媒の核酸を含む試料溶液における最終濃度は、5~90質量%であることが好ましい。

【0047】

前記前処理液は、好ましくはpH5~10、より好ましくはpH6~9、さらに好ましくはpH7~8のものが用いられる。

【0048】

また、得られた核酸を含む試料溶液は、表面張力は 0.05 J/m^2 以下、粘度は1~10000mPa、比重は0.8~1.2の範囲であることが好ましい。この範囲の溶液にすることで、次の工程において、核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸を吸着させた後に残った溶液を除去しやすくする。

【0049】

前記(a)~(c)の工程により、例えば、対象となる試料が全血の場合に必要な、A.赤血球の除去、B.各種タンパク質の除去、及びC.白血球の溶解及び核膜の溶解が迅速に行われる。A.赤血球の除去およびB.各種タンパク質の除去は、膜への非特異吸着および多孔性膜の目詰まりを防止し、C.白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させる。

【0050】

核酸を含む検体は、単一の核酸を含む検体でもよいし、異なる複数種類の核酸を含む検体でもよい。また、検体の数は一つでも複数であってもよい。すなわち、複数の容器を用いて複数の検体を並列処理してもよい。前記核酸分離精製方法に供される核酸の長さは、特に限定されず、例えば、数bp~数Mbpの任意の長さの核酸であってもよい。取扱い上の観点からは、回収に供される核酸の長さは一般的には、数bp~数百kbp程度であることが好ましい。前記核酸分離精製方法は、従来の核酸分離精製方法、すなわち簡易的

な核酸分離精製方法に対し、比較的長い核酸を迅速に取り出すことができる。好ましくは 50 kbp 以上、より好ましくは 70 kbp、更に好ましくは 100 kbp 以上の核酸を回収に用いることができる。回収する核酸の種類は、DNA や RNA 等、特に制限されない。

【0051】

次に、前記 (1) ~ (3) の工程について述べる。

【0052】

本発明の核酸分離精製方法は、前述のとおり、(1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程（以下、「吸着工程」とも称する。）、(2) 該核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程（以下、「洗浄工程」とも称する。）、及び (3) 回収液を、該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程（以下、「脱着工程」または「回収工程」とも称する。）を少なくとも含むものである。

【0053】

好ましくは、前記 (1)、(2) 及び (3) の各工程において、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を、加圧状態で核酸吸着性多孔性膜に通過させるものであり、より好ましくは、前記 (1)、(2) 及び (3) の各工程において、少なくとも二個の開口を有する容器内に該核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に、核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を注入し、カートリッジの前記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて、該注入した各液を通過させ、他の開口より排出させるものである。核酸を含む試料溶液、洗浄液又は回収液を前記多孔性膜に通過させることにより、装置をコンパクトに自動化することができ、好ましい。

【0054】

更に好ましくは、以下の工程で核酸を分離精製することができる。すなわち、

(i) 核酸を含む試料溶液を少なくとも二個の開口を有する容器内に溶液が、内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、

(i i) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、

(i i i) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に洗浄液を注入する工程、

(i v) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した洗浄液を核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって核酸吸着性多孔性膜を核酸が吸着した状態で洗浄する工程、

(v) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に回収液を注入する工程、

(v i) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にし、注入した回収液を核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程を挙げることができる。

【0055】

また、別の態様としては、

(i) 核酸を含む核酸混合物溶液を、少なくとも二個の開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、

(i i) 核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した核酸を含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによ

って、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、

(i i i) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に洗浄液を注入する工程、

(i v) 核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、

(v) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に回収液を注入する工程、

(v i) 核酸分離精製カートリッジの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて核酸分離精製カートリッジ内を減圧状態にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程

をおこなうことができる。

【0056】

また、別の核酸分離精製工程としては、

(i) 核酸を含む核酸混合物溶液を、少なくとも二つの開口を有する容器内に、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジの一の開口に注入する工程、

(i i) 核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した核酸を含む核酸混合物溶液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、

(i i i) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に洗浄液を注入する工程、

(i v) 核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜を、核酸が吸着した状態で、洗浄する工程、

(v) 核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に回収液を注入する工程、

(v i) 核酸分離精製カートリッジに遠心力を作用させ、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、他の開口より排出することによって、核酸吸着性多孔性膜内から核酸を脱着させ、核酸分離精製カートリッジ容器外に排出する工程を行うこともできる。

【0057】

前記の核酸分離精製の工程(1)～(3)では、最初の核酸を含む試料液を注入から核酸分離精製カートリッジ外に核酸を得るまでの工程を20分以内、好適な状況では2分以内で迅速に終了することが可能である。また、前記の核酸分離精製の工程では核酸を検体中に含まれる全量に対して50質量%以上、好適な状況では90質量%以上の収率で得る事が可能である。

【0058】

前記の核酸分離精製の工程では、1kbpから200kbp、特に20kbpから140kbpと広範囲に及ぶ分子量の核酸を回収することができる。すなわち、従来行なわれているガラスフィルターを用いたスピンカラム法(キアゲン社)に比べて長鎖の核酸を回収できる。

【0059】

前記の核酸分離精製の工程では、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)が、DNAの場合は1.6～2.0、RNAの場合は1.8～2.2となる純度を持つ核酸を回収することができ、不純物混入量の少ない高純度の核酸を定常的に得ることができる。さらには、紫外可視分光光度計での測定値(260nm/280nm)がDNAの場合は1.8付近、RNAの場合は2.0付近となる純度を持つ核酸を回収することができる。

【0060】

前記工程において、圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、あるいはペリスタポンプのような加圧が可能なポンプ等、或いは、エバポレーター等の減圧可能なものが挙げ

られる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペットは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、核酸分離精製カートリッジの一の開口に着脱可能に結合されている。

【0061】

以下に、本発明で用いる核酸吸着性多孔性膜および吸着工程について説明する。

〔核酸吸着性多孔性膜および吸着工程〕

本発明の核酸吸着性多孔性膜は、溶液が内部を通過可能なものである。ここで「溶液が内部を通過可能」とは、膜の一方の面が接する空間と膜の他方の面が接する空間の間に圧力差を生じさせた場合に、高圧の空間側から低圧の空間側へと、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。または、膜に遠心力を掛けた場合に、遠心力の方向に、膜の内部を溶液が通過することが可能であることを意味する。

【0062】

本発明の核酸吸着性多孔性膜は、イオン結合が実質的に関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であることを特徴とする。これは、多孔性膜側の使用条件で「イオン化」していないことを意味し、環境の極性を変化させることで、核酸と多孔性膜が引き合うようになることと推定される。これにより分離性能に優れ、しかも洗浄効率よく、核酸を単離精製することができる。好ましくは、核酸吸着性多孔性膜は、親水基を有する多孔性膜であり、環境の極性を変化させることで、酢酸と多孔性膜の親水基同士が引きあうようになることと推定される。

【0063】

親水基とは、水との相互作用を持つことができる有極性の基（原子団）を指し、核酸の吸着に関与する全ての基（原子団）が当てはまる。親水基としては、水との相互作用の強さが中程度のもの（化学大事典、共立出版株式会社発行、「親水基」の項の「あまり親水性の強くない基」参照）が良く、例えば、水酸基、カルボキシル基、シアノ基、オキシエチレン基などを挙げることができる。好ましくは水酸基である。

【0064】

ここで、親水基を有する多孔性膜とは、多孔性膜を形成する材料自体が親水性基を有する多孔性膜、または多孔性膜を形成する材料を処理またはコーティングすることによって親水基を導入した多孔性膜を意味する。多孔性膜を形成する材料は有機物、無機物のいずれでも良い。例えば、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する有機材料である多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜、多孔性膜を形成する材料自体が親水基を有する無機材料である多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜を処理して親水基を導入した多孔性膜、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に対し親水基を有する材料でコーティングして親水基を導入した多孔性膜などを使用することができるが、加工の容易性から、多孔性膜を形成する材料は有機高分子などの有機材料を用いることが好ましい。

【0065】

親水基を有する材料の多孔性膜としては、水酸基を有する有機材料の多孔性膜を挙げることができる。水酸基を有する有機材料の多孔性膜としては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物などで形成された多孔性膜を挙げることができるが、特に多糖構造を有する有機材料の多孔性膜を好ましく使用することができる。

。

【0066】

水酸基を有する有機材料の多孔性膜として好ましくは、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物から成る有機高分子の多孔性膜を使用することができる。アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物として、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物、トリアセチルセルロースと

ースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物を好ましく使用する事ができる。特にトリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物を好ましく使用することができる。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースの混合比(質量比)は、99:1~1:99である事が好ましく、90:10~50:50である事がより好ましい。

【0067】

特に好ましい、水酸基を有する有機材料としては、特開2003-128691号公報に記載の、アセチルセルロースの表面鹸化物が挙げられる。アセチルセルロースの表面鹸化物とは、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物を鹸化处理したものであり、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の鹸化物、トリアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹸化物、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹸化物、ジアセチルセルロースとモノアセチルセルロース混合物の鹸化物も好ましく使用することができる。より好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の鹸化物を使用することである。トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比(質量比)は、99:1~1:99であることが好ましい。更に好ましくは、トリアセチルセルロースとジアセチルセルロース混合物の混合比は、90:10~50:50であることである。この場合、鹸化处理の程度(鹸化率)で固相表面の水酸基の量(密度)をコントロールすることができる。核酸の分離効率をあげるためには、水酸基の量(密度)が多い方が好ましい。鹸化处理により得られる有機材料の鹸化率(表面鹸化率)が5%以上100%以下であることが好ましく、10%以上100%以下であることが更に好ましい。また、水酸基を有する有機材料の表面積を大きくするために、アセチルセルロースの多孔性膜を鹸化处理することが好ましい。多孔性膜は、表裏対称性の多孔性膜であってもよいが、表裏非対称性の多孔性膜を好ましく使用することができる。

【0068】

ここで、鹸化处理とは、アセチルセルロースを鹸化处理液(例えば水酸化ナトリウム水溶液)に接触させることを言う。これにより、鹸化处理液に接触したアセチルセルロースの部分は、再生セルロースとなり水酸基が導入される。こうして作成された再生セルロースは、本来のセルロースとは、結晶状態等の点で異なっている。本発明において核酸吸着性多孔性膜として、再生セルロースの多孔性膜を用いることが特に好ましい。

又、鹸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えて鹸化处理を行えば良い。鹸化率は、NMRにより、容易に測定することができる(例えば、カルボニル基のピーク減少の程度で定めることができる)。

【0069】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法として、ポリマー鎖内または側鎖に親水基を有すグラフトポリマー鎖を多孔性膜に結合することができる。

有機材料の多孔性膜にグラフトポリマー鎖を結合する方法としては、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、多孔性膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させグラフトポリマー鎖とする2つの方法がある。

【0070】

まず、多孔性膜とグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法においては、ポリマーの末端または側鎖に多孔性膜と反応する官能基を有するポリマーを使用し、この官能基と多孔性膜の官能基とを化学反応させることでグラフトさせることができる。多孔性膜と反応する官能基としては、多孔性膜の官能基と反応し得るものであれば特に限定はないが、例えば、アルコキシシランのようなシランカップリング基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基、エポキシ基、アリル基、メタクリロイル基、アクリロイル基等を挙げることができる。

ポリマーの末端、または側鎖に反応性官能基を有するポリマーとして特に有用な化合物は、トリアルコキシシリル基をポリマー末端に有するポリマー、アミノ基をポリマー末端に有するポリマー、カルボキシル基をポリマー末端に有するポリマー、エポキシ基をポリ

マー末端に有するポリマー、イソシアネート基をポリマー末端に有するポリマーが挙げられる。この時に使用されるポリマーとしては、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、具体的には、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレンなどを挙げることができる。

【0071】

多孔性膜を起点として重合可能な二重結合を有する化合物を重合させ、グラフトポリマー鎖とする方法は、一般的には表面グラフト重合と呼ばれる。表面グラフト重合とは、プラズマ照射、光照射、加熱などの方法で基材表面上に活性種を与え、多孔性膜と接するように配置された重合可能な二重結合を有する化合物を重合によって多孔性膜と結合させる方法を指す。

基材に結合しているグラフトポリマー鎖を形成するのに有用な化合物は、重合可能な二重結合を有しており、核酸の吸着に関与する親水基を有するという、2つの特性を兼ね備えていることが必要である。これらの化合物としては、分子内に二重結合を有していれば親水基を有するポリマー、オリゴマー、モノマーのいずれの化合物をも用いることができる。特に有用な化合物は親水基を有するモノマーである。

特に有用な親水基を有するモノマーの具体例としては、例えば、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリセロールモノメタクリレート等の水酸性基含有モノマーである。また、アクリル酸、メタアクリル酸等のカルボキシル基含有モノマー、もしくはそのアルカリ金属塩及びアミン塩も好ましく用いることができる。

【0072】

親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物などを挙げることができるが、多糖構造を有するポリマーが好ましい。

【0073】

また、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたはアセチル価の異なるアセチルセルロース混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたはアセチル価の異なるアセチルセルロース混合物を鹸化処理することもできる。この場合、鹸化率が5%以上100%以下であることが好ましい。さらには、鹸化率が10%以上100%以下であることが好ましい。

【0074】

親水基を有する無機材料である多孔性膜としては、シリカ化合物を含有する多孔性膜を挙げることができる。シリカ化合物を含有する多孔性膜としては、ガラスフィルターを挙げることができる。また、特許公報第3058342号に記載されているような、多孔質のシリカ薄膜を挙げることができる。この多孔質のシリカ薄膜とは、二分子膜形成能を有するカチオン型の両親媒性物質の展開液を基板上に展開した後、基板上の液膜から溶媒を除去することによって両親媒性物質の多層二分子膜薄膜を調整し、シリカ化合物を含有する溶液に多層二分子膜薄膜を接触させ、次いで前記多層二分子膜薄膜を抽出除去することで作製することができる。

【0075】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法としては、多孔性膜と親水基を持つグラフトポリマー鎖とを化学結合させる方法と、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用して、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重

合する2つの方法がある。

多孔性膜と親水基を持つグラフトポリマー鎖とを化学結合させる場合は、グラフトポリマー鎖の末端の官能基と反応する官能基を無機材料に導入し、そこにグラフトポリマーを化学結合させる。また、分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを使用し、多孔性膜を起点として、グラフトポリマー鎖を重合する場合は、二重結合を有する化合物を重合する際の起点となる官能基を無機材料に導入する。

【0076】

親水基を持つグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーとしては、前記、親水基を持たない有機材料の多孔性膜に親水基を導入する方法において、記載した親水性基を有するグラフトポリマー、および分子内に二重結合を有している親水基を有するモノマーを好ましく使用することができる。

【0077】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜に親水基を導入する別の方法として、親水基を有する材料をコーティングすることができる。コーティングに使用する材料は、核酸の吸着に関与する親水基を有するものであれば特に限定はないが、作業の容易さから有機材料のポリマーが好ましい。ポリマーとしては、ポリヒドロキシエチルアクリル酸、ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸及びそれらの塩、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸及びそれらの塩、ポリオキシエチレン、アセチルセルロース、アセチル価の異なるアセチルセルロース混合物などを挙げるることができる。

【0078】

また、親水基を持たない無機材料の多孔性膜に、アセチルセルロースまたはアセチル価の異なるアセチルセルロース混合物をコーティングした後に、コーティングしたアセチルセルロースまたはアセチル価の異なるアセチルセルロース混合物を鹸化処理することもできる。この場合、鹸化率が5%以上100%以下であることが好ましい。さらには、鹸化率が10%以上100%以下であることが好ましい。

【0079】

親水基を持たない無機材料の多孔性膜としては、アルミニウム等の金属、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックス、もしくはニューセラミックス、シリコン、活性炭等を加工して作製した多孔性膜を挙げることができる。

【0080】

前記の核酸吸着性多孔性膜は、溶液が内部を通過可能であり、厚さが $10\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ であることが好ましい。さらに好ましくは、厚さが $50\mu\text{m}$ ～ $250\mu\text{m}$ である。洗浄がし易い点で、厚さが薄いほど好ましい。

【0081】

前記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、最小孔径が $0.22\mu\text{m}$ 以上であることが好ましい。さらに好ましくは、最小孔径が $0.5\mu\text{m}$ 以上である。また、最大孔径と最小孔径の比が2以上である多孔性膜を用いる事が好ましい。さらに好ましくは、最大孔径と最小孔径の比が5以上である。これにより、核酸が吸着するのに十分な表面積が得られるとともに、目詰まりし難い。

【0082】

前記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、空隙率が50～95%であることが好ましい。さらに好ましくは、空隙率が65～80%である。また、バブルポイントが、 $0.1\sim 10\text{kgf}/\text{cm}^2$ である事が好ましい。さらに好ましくは、バブルポイントが、 $0.2\sim 4\text{kgf}/\text{cm}^2$ である。

【0083】

前記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、圧力損失が、 $0.1\sim 100\text{kPa}$ である事が好ましい。これにより、過圧時に均一な圧力が得られる。さらに好ましくは、圧力損失が、 $0.5\sim 50\text{kPa}$ である。ここで、圧力損失とは、膜の厚さ $100\mu\text{m}$ あたり、水を通過させるのに必要な最低圧力である。

【0084】

前記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、25℃で1kg/cm²の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜1cm²あたり1分間で1~5000mLであることが好ましい。さらに好ましくは、25℃で1kg/cm²の圧力で水を通過させたときの透水量が、膜1cm²あたり1分間で5~1000mLである。

【0085】

前記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.1μg以上である事が好ましい。さらに好ましくは、多孔性膜1mgあたりの核酸の吸着量が0.9μg以上である。

【0086】

前記の、溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、一辺が5mmの正方形の多孔性膜をトリフルオロ酢酸5mLに浸漬したときに1時間以内では溶解しないが、48時間以内に溶解するセルロース誘導体が好ましい。また、一辺が5mmの正方形の多孔質膜をトリフルオロ酢酸5mLに浸漬したときに1時間以内に溶解するが、ジクロロメタン5mLに浸漬したときには24時間以内に溶解しないセルロース誘導体がさらに好ましい。

【0087】

核酸吸着性多孔性膜中を核酸を含む試料溶液を通過させる場合、試料溶液を一方の面から他方の面へと通過させることが液を多孔性膜へ均一に接触させることができる点で好ましい。

【0088】

核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させる場合の流速は、液の多孔性膜への適切な接触時間を得るために、膜の面積cm²あたり、2~1500μL/secである事が好ましい。液の多孔性膜への接触時間が短すぎると十分な分離精製効果が得られず、長すぎると操作性の点から好ましくない。さらに、前記流速は、膜の面積cm²あたり、5~700μL/secである事が好ましい。

【0089】

また、使用する溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜は、1枚であってもよいが、複数枚を使用することもできる。複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

【0090】

複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、無機材料の核酸吸着性多孔性膜と有機材料の核酸吸着性多孔性膜との組合せであっても良い。例えば、ガラスフィルターと再生セルロースの多孔性膜との組合せを挙げることができる。また、複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、無機材料の核酸吸着性多孔性膜と有機材料の核酸非吸着性多孔性膜との組合せであってもよい、例えば、ガラスフィルターと、ナイロンまたはポリスルホンの多孔性膜との組合せを挙げることができる。

【0091】

少なくとも二つの開口を有する容器内に、前記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。また、少なくとも二つの開口を有する容器内に、前記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を複数枚収容した核酸分離精製カートリッジを好ましく使用することができる。この場合、少なくとも二つの開口を有する容器内に収容される複数枚の核酸吸着性多孔性膜は、同一のものであっても、異なるものであってもよい。

【0092】

核酸分離精製カートリッジは、少なくとも二つの開口を有する容器内に、前記のような溶液が内部を通過可能な核酸吸着性多孔性膜を収容する以外、その他の部材を収容していないことが好ましい。前記の容器の材料としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニルなどのプラスチックを使用することができる。また、生分解性の材料も好ましく使用することができる。また、前記の容器は透明であっても、着色してあってもよい。

【0093】

[洗浄工程]

以下、洗浄工程について説明する。洗浄を行うことにより、核酸の回収量及び純度が向上し、必要な核酸を含む検体の量を微量とすることができ、また、洗浄や回収操作を自動化することによって、操作が簡便かつ迅速に行うことが可能になる。洗浄工程は、迅速化のためには1回の洗浄で済ませてもよく、また純度がより重要な場合には複数回洗浄を繰返すことが好ましい。

【0094】

洗浄工程において、洗浄液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジへ供給される。供給された洗浄液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスポイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、洗浄液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より洗浄液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が、洗浄効率が優れてより好ましい。

洗浄工程における洗浄液の液量は、 $2\mu\text{l}/\text{mm}^2$ 以上が好ましい。洗浄液量が多量であれば洗浄効果は向上する。しかし、 $200\mu\text{l}/\text{mm}^2$ 以下とすることで、操作性を保ち、試料の流出を抑止することができ好ましい。

【0095】

洗浄工程において、洗浄液を核酸吸着性多孔性膜に通過させる場合の流速は、膜の単位面積（ cm^2 ）あたり、 $2\sim 1500\mu\text{L}/\text{sec}$ であることが好ましく、 $5\sim 700\mu\text{L}/\text{sec}$ であることがより好ましい。通過速度を下げて時間を掛ければ洗浄がそれだけ十分に行なわれることになる。しかし、前記の範囲とすることで、洗浄効率を落とすことなく、核酸の分離精製操作を迅速化でき、好ましい。

【0096】

洗浄工程において、洗浄液の液温は $4\sim 70^\circ\text{C}$ であることが好ましい。さらには、洗浄液の液温を室温とすることがより好ましい。また、洗浄工程において、洗浄工程と同時に核酸分離精製カートリッジに器械的な振動や超音波による攪拌を与えることもできる。または遠心分離を行うことにより洗浄することもできる。

【0097】

洗浄工程において、洗浄液は、水溶性有機溶媒及び/または水溶性塩を含んでいる溶液であることが好ましい。洗浄液は、核酸吸着性多孔性膜に核酸と共に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する必要がある。そのためには、核酸吸着性多孔性膜から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成であることが必要である。この目的には、アルコール等の水溶性有機溶媒が核酸に難溶性であるので、核酸を保持したまま核酸以外の成分を脱着させるのに適している。また、水溶性塩を添加することにより、核酸の吸着効果が高まるので、不純物および不要成分の選択的除去作用が向上する。

【0098】

洗浄液に含まれる水溶性有機溶媒としては、アルコール、アセトンなどを用いることができ、アルコールが好ましい。アルコールとしては、メタノール、エタノール、プロパノール、およびブタノールが挙げられる。プロパノールとしては、イソプロパノール、*n*-プロパノールのいずれでもよく、ブタノールも直鎖状でも分岐状でもよい。これらアルコールは、複数種類を使用することもできる。この中でも、エタノールを用いることが好ましい。洗浄液中に含まれる水溶性有機溶媒の量は、 $20\sim 100$ 質量%であることが好ましく、 $40\sim 80$ 質量%であることがより好ましい。

【0099】

一方、洗浄液に含まれる水溶性塩は、ハロゲン化物の塩であることが好ましく、中でも

塩化物がより好ましい。また、水溶性塩は、一価または二価のカチオンであることが好ましく、特にアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩が好ましく、中でもナトリウム塩及びカリウム塩が好ましく、ナトリウム塩が最も好ましい。

水溶性塩が洗浄液中に含まれる場合、その濃度は10 mM/L以上であることが好ましく、その上限は不純物の溶解性を損なわない範囲であれば特に問わないが、1 M/L以下であることが好ましく、0.1 M/L以下であることがより好ましい。よりさらに好ましくは、水溶性塩が塩化ナトリウムであり、とりわけ、塩化ナトリウムが20 mM/L以上含まれていることが好ましい。

【0100】

洗浄液は、カオトロピック物質を含んでいないことが好ましい。それによって、洗浄工程に引き続く回収工程にカオトロピック物質が混入する可能性を減らすことができる。回収工程時に、カオトロピック物質が混入すると、しばしばPCR反応等の酵素反応を阻害するので、後の酵素反応等を考慮すると洗浄液にカオトロピック物質を含まないことが理想的である。また、カオトロピック物質は、腐食性で有害であるので、この点でもカオトロピック物質を用いないで済むことは、実験者にとっても試験操作の安全上極めて有利である。ここでカオトロピック物質とは、前記した尿素、グアニジン塩、イソチアン酸ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウムなどである。

【0101】

従来、核酸分離精製工程における洗浄工程の際、洗浄液がカートリッジなどの容器に対する濡れ性が高いために、しばしば洗浄液が容器中に残留することになり、洗浄工程に続く回収工程への洗浄液の混入して核酸の純度の低下や次工程における反応性の低下などの原因となっている。したがって、カートリッジなどの容器を用いて核酸の吸着及び脱着を行う場合、吸着、洗浄時に用いる液、特に洗浄液が、次の工程に影響を及ぼさないように、カートリッジ内に洗浄残液が残留しないことは重要である。

【0102】

したがって、洗浄工程における洗浄液が次工程の回収液に混入することを防止して、洗浄液のカートリッジ内への残留を最小限に留めるため、洗浄液の表面張力を0.035 J/m²未満が好ましい。表面張力が低いと、洗浄液とカートリッジの濡れ性が向上し、残留する液量を抑えることができる。

【0103】

しかし、洗浄効率を上げる為に、水の割合を増やすことができるが、この場合、洗浄液の表面張力は上昇し、残留する液量が増える。洗浄液の表面張力が0.035 J/m²以上の場合、カートリッジの撥水性を高めることで、残留する液量を抑えることができる。カートリッジの撥水性を高めることで、液滴を形成させ、その液滴が流れ落ちることによって残留する液量が抑制できる。撥水性を高める方法としては、カートリッジ表面にシリコン等の撥水剤をコートするか、カートリッジ成型時にシリコン等の撥水剤を練り込む等の手段があるが、これに限らない。

【0104】

本発明に係る核酸吸着性多孔性膜を利用して洗浄工程を簡素化することができる。(1) 洗浄液が核酸吸着性多孔性膜を通過する回数を1回としてもよい。(2) 洗浄工程を室温でもできる。(3) 洗浄後、直ちに回収液をカートリッジに注入することもできる。(4) 前記(1)、(2)、(3)のいずれか1つもしくは2つ以上組み合わせることも可能である。従来法においては、洗浄液中に含まれる有機溶媒を迅速に取り除くためには、しばしば乾燥工程を必要としたが、本発明に用いる核酸吸着性多孔性膜は薄膜であるために乾燥工程を省略できる。

【0105】

従来、核酸分離精製方法において、洗浄工程の際、しばしば洗浄液が飛散し他に付着することによって、試料のコンタミネーション(汚染)が起きることが問題となっている。洗浄工程におけるこの種のコンタミネーションは、二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと廃液容器の形状とを工夫することに

よって抑止することができる。

【0106】

〔脱着工程（回収工程）〕

以下に核酸吸着性多孔性膜から核酸を脱着させて回収する工程について示す。

回収工程において、回収液は、チューブ、ピペット、又は自動注入装置、もしくはこれらと同じ機能をもつ供給手段を使用して、核酸吸着性多孔性膜を装着した核酸分離精製カートリッジへ供給される。回収液は、核酸分離精製カートリッジの一の開口（核酸を含む試料溶液を注入した開口）から供給され、該開口に結合された圧力差発生装置（例えばスボイド、注射器、ポンプ、パワーピペットなど）を用いて核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態にして核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出させることができる。また、回収液を一の開口から供給し、同じ一の開口より排出させることもできる。さらには、核酸分離精製カートリッジの核酸を含む試料溶液を供給した一の開口と異なる開口より回収液を供給し、排出させることも可能である。しかしながら、核酸分離精製カートリッジの一の開口から供給し、核酸吸着性多孔性膜を通過させ、一の開口と異なる開口より排出する方法が、回収効率が優れてより好ましい。

【0107】

検体から調整した核酸を含む試料溶液の体積に対して、回収液の体積を調整して核酸の脱着を行うことができる。分離精製された核酸を含む回収液量は、そのとき使用する検体量による。一般的によく使われる回収液量は数10から数100 μ lであるが、検体量が極微量である時や、逆に大量の核酸を分離精製したい場合には回収液量は1 μ lから数10mlの範囲で変える事ができる。

【0108】

回収液としては好ましくは精製蒸留水、Tris/EDTAバッファ等が使用でき、pHは、pH2～11であることが好ましい。さらには、pH5～9であることが好ましい。また特にイオン強度と塩濃度は吸着核酸の溶出に効果を及ぼす。回収液は、290mmol/L以下のイオン強度であることが好ましく、さらには、90mmol/L以下の塩濃度であることが好ましい。こうすることで、核酸の回収率が向上し、より多くの核酸を回収することができる。

【0109】

回収液の体積を当初の核酸を含む試料溶液の体積と比較して少なくすることによって、濃縮された核酸を含む回収液を得ることができる。好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積)=1:100～99:100であり、更に好ましくは、(回収液体積):(試料溶液体積)=1:10～9:10である。これにより核酸分離精製後工程において濃縮のための操作をすることなく、簡単に核酸を濃縮できる。これらの方法により検体よりも核酸が濃縮されている核酸溶液を得る方法を提供できる。

【0110】

回収液の注入回数は限定されるものではなく、1回でも複数回でもよい。通常、迅速、簡便に核酸を分離精製する場合は、1回の回収で実施するが、大量の核酸を回収する場合等複数回にわたり回収液を注入してもよい。

【0111】

また、回収工程において、核酸の回収液に回収した核酸の分解を防ぐための安定化剤を添加しておくことも可能である。安定化剤としては、抗菌剤、抗カビ剤や核酸分解抑制剤などを添加することができる。核酸分解抑制剤としては、核酸分解酵素の阻害剤が挙げられ、具体的にはEDTAなどが挙げられる。また別の実施態様として、回収容器にあらかじめ安定化剤を添加しておくこともできる。

【0112】

前記の核酸分離精製方法に用いる、少なくとも二つの開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を收容した核酸分離精製カートリッジと、核酸を含む試料溶液を得る(a)～(c)の工程、並びに、(1)～(3)の吸着、洗浄及び回収の各工程に用いる試薬をキットとすることができる。

【0113】

前記の、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程は、工程を自動で行う自動装置を用いて行うことができる。前記の核酸分離精製方法は、自動化に適している方法である。また、小型化にも適している方法である。自動装置により、操作が簡便化および迅速化するだけでなく、作業者の技能によらず一定の水準の、核酸を得ることが可能になる。

【0114】

以下に、少なくとも二個の開口を有する容器内に核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジと圧力発生装置を用いて、核酸を含む検体から核酸を分離精製する工程を自動で行う自動装置の例を示すが、自動装置はこれに限定されるものではない。

【0115】

自動装置は、溶液が内部を通過可能な、核酸吸着性多孔性膜を収容した核酸分離精製カートリッジを用い、該核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入し加圧して該試料液中の核酸を前記核酸吸着性多孔性膜に吸着させた後、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液を分注し加圧して不純物を除去した後、前記核酸分離精製カートリッジに、回収液を分注し核酸吸着性多孔性膜に吸着した核酸を脱着して回収液とともに回収する、分離精製動作を自動的に行う核酸分離精製装置であって、前記核酸分離精製カートリッジ、前記試料液および洗浄液の排出液を収容する廃液容器および前記核酸を含む回収液を収容する回収容器を保持する搭載機構と、前記核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、前記核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備えてなることを特徴とするものである。

【0116】

前記搭載機構は、装置本体に搭載されるスタンドと、該スタンドに上下移動可能に支持され前記核酸分離精製カートリッジを保持するカートリッジホルダーと、該カートリッジホルダーの下方で前記核酸分離精製カートリッジに対する位置を交換可能に前記廃液容器および前記回収容器を保持する容器ホルダーとを備えてなるものが好適である。

【0117】

また、前記加圧エア供給機構は、下端部より加圧エアを噴出するエアノズルと、該エアノズルを支持して前記カートリッジホルダーに保持された前記核酸分離精製カートリッジに対し前記エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、該加圧ヘッドに設置され前記搭載機構のラックにおける核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えてなるものが好適である。

【0118】

また、前記分注機構は、前記洗浄液を分注する洗浄液分注ノズルと、前記回収液を分注する回収液分注ノズルと、前記洗浄液分注ノズルおよび前記回収液分注ノズルを保持し前記搭載機構に保持された核酸分離精製カートリッジ上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液を収容した洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し前記洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液を収容した回収液ボトルより回収液を吸引し前記回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えてなるものが好適である。

【0119】

前記のような自動装置によれば、核酸分離精製カートリッジ、廃液容器および回収容器を保持する搭載機構と、核酸分離精製カートリッジに加圧エアを導入する加圧エア供給機構と、核酸分離精製カートリッジに洗浄液および回収液を分注する分注機構とを備え、核酸吸着性多孔性膜部材を備えた核酸分離精製カートリッジに核酸を含む試料液を注入加圧し核酸を核酸吸着性多孔性膜部材に吸着させた後、洗浄液を分注して不純物を洗浄排出した後、回収液を分注して核酸吸着性多孔性膜部材に吸着した核酸を分離して回収する核酸分離精製工程を自動的に行って短時間で効率よく試料液の核酸を自動的に分離精製できる機構をコンパクトに構成することとができる。

【0120】

また、前記搭載機構を、スタンドと、核酸分離精製カートリッジを保持する上下移動可能なカートリッジホルダーと、廃液容器および回収容器を交換可能に保持する容器ホルダーとを備えて構成すると、核酸分離精製カートリッジおよび両容器のセット並びに廃液容器と回収容器の交換が簡易に行える。

【0121】

また、前記加圧エア供給機構を、エアノズルと、該エアノズルを昇降移動させる加圧ヘッドと、核酸分離精製カートリッジの位置決めをする位置決め手段とを備えて構成すると、簡易な機構で確実な加圧エアの供給が行える。

【0122】

また、前記分注機構を、洗浄液分注ノズルと、回収液分注ノズルと、核酸分離精製カートリッジ上を順に移動可能なノズル移動台と、洗浄液ボトルより洗浄液を吸引し洗浄液分注ノズルに供給する洗浄液供給ポンプと、回収液ボトルより回収液を吸引し回収液分注ノズルに供給する回収液供給ポンプとを備えて構成すると、簡易な機構で順次洗浄液および回収液の分注が行える。

【0123】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0124】

(1) 核酸精製カートリッジの作成

内径7mm、核酸吸着性多孔性膜を収容する部分を持つ核酸精製カートリッジをハイインパクトポリスチレンで作成した。

【0125】

(2) 核酸吸着性多孔性膜として、トリアセチルセルロースの多孔性膜を酸処理した多孔性膜(孔径 $2.5\mu\text{m}$ 、直径7mm、厚さ $100\mu\text{m}$ 、酸化率95%)を使用し、前記(1)で作成した核酸精製カートリッジの核酸吸着性多孔性膜収納部に収容した。

【0126】

(3) 前処理液及び洗浄液の調製

表1に示す処方の前処理液及び洗浄液を調製した。

【0127】

【表1】

(前処理液)

β -メルカプトエタノール	9g
塩酸グアニジン(ライフテクノロジー社製)	382g
Tris(ライフテクノロジー社製)	12.1g
Triton-X100(ICN製)	10g
蒸留水	1000mlになるよう添加

(洗浄液)

10mM Tris-HCL

30%エタノール

【0128】

(4) 核酸分離精製操作

ガン化ヒト骨髄細胞(HL60)培養液を用意した。この培養液 $200\mu\text{l}$ (細胞数 5×10^5 個)をヌクレアーゼフリーかつパイロジェンフリーのチップ(プラチナチップBM機器社製)を装着した分注用ピペット(PIPETMAN ギルソン社製)を用いて、ヌクレアーゼフリーかつパイロジェンフリーの1.5mLマイクロチューブ(プラチナチ

ューブ BM機器社製)の容器に注入し、前記前処理液200 μ lとタンパク質分解酵素のプロテアーゼK (SIGMA製)溶液20 μ lを添加してVORTEXを15秒かけることによって混合し、60℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、エタノール200 μ lを加え、攪拌した。攪拌後、前記(2)で作成した核酸吸着性多孔性膜を有する核酸精製カートリッジの一の開口に注入し、続いて前記一の開口に圧力差発生装置(チュウピングポンプ)を結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(80kpa)にし、注入した核酸を含む試料溶液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させることで、核酸吸着性多孔性膜に接触させ、核酸分離精製カートリッジの他の開口より排出した。続いて、前記核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に洗浄液を注入し、前記一の開口にチュウピングポンプを結合し、核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(80kpa)にし、注入した洗浄液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出した。続いて、前記核酸分離精製カートリッジの前記一の開口に回収液を注入し、核酸分離精製カートリッジの前記一の開口にチュウピングポンプを結合して核酸分離精製カートリッジ内を加圧状態(80kpa)にし、注入した回収液を、核酸吸着性多孔性膜に通過させ、他の開口より排出し、この液を回収した。核酸分離精製操作(核酸を含む試料溶液を前記のカートリッジに注入してから回収するまで)に要した時間は2分であった。

【0129】

(5) 核酸の回収量の定量

実施例1の実験を行った。図1に、本発明の方法に従って核酸を含む試料溶液から精製した核酸の電気泳動の結果を示す。

【0130】

図1の結果から明らかなように、本発明の方法を用いることにより、核酸を極めて効率よく、分離精製できることが分かる。すなわち、本発明の方法は、分離性能に優れ、洗浄効率がよいために、前記した時間で、迅速に収量高く、核酸を得ることができた。

【図面の簡単な説明】

【0131】

【図1】本発明の方法に従って分離精製した核酸および分子量マーカーを電気泳動して得られた図である。

【書類名】 図面
【図 1】



本発明

サイズマーカー(λ HindⅢ)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 分離性能良く、簡便で、迅速に、自動化可能に、核酸を含む検体から核酸を分離精製する方法を提供する。

【解決手段】 (1) 核酸を含む試料溶液を核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内に核酸を吸着させる工程、(2) 洗浄液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、核酸が吸着した状態で該多孔性膜を洗浄する工程、(3) 回収液を該核酸吸着性多孔性膜に通過させて、該多孔性膜内から核酸を脱着させる工程を含有する核酸分離精製方法において、該核酸吸着性多孔性膜はイオン結合が関与しない相互作用で核酸が吸着する多孔性膜であり、前記核酸を含む試料溶液が、(a) 検体を容器に注入する工程、(b) 前記容器に、カオトロピック塩、界面活性剤、消泡剤、タンパク質分解酵素および核酸安定化剤の中から選ばれる化合物を含む前処理液を添加し、検体を混合し、混合液を得る工程、(c) 前記混合液に水溶性有機溶媒を添加する工程を含む方法で得られることを特徴とする核酸分離精製方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 6 6 8 0 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/013384

International filing date: 08 September 2004 (08.09.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-066801
Filing date: 10 March 2004 (10.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.